

禽致病性大肠杆菌 I 型菌毛 *fimH* 基因缺失突变株的构建 及部分生物学特性的分析

何素芬¹, 原志伟^{1,2}, 朱国强^{1*}

(¹扬州大学兽医学院, 扬州 225009)

(²中华人民共和国荣成出入境检验检疫局, 荣成 264300)

摘要: 基于禽大肠杆菌 I 型菌毛黏附素 *fimH* 基因的已知序列, 利用噬菌体的 Red 重组系统构建禽致病性大肠杆菌国内分离株 A2(血清型 O2:K89) 型菌毛黏附素 *fimH* 基因缺失突变株 A2 *fimH*::*Cat*, 在二次重组中利用携带能够表达 FLP 位点特异性重组酶的质粒 pCP20(温度敏感性)以去除上述缺失突变株中抗性基因标志, 结合 PCR 扩增和测序结果, 证明 *fimH* 基因缺失株 A2 *fimH* 的正确构建。通过 *fimH* 基因互补试验使 A2 *fimH* 缺失突变株恢复了与野生株具有相同的凝集活性。红细胞和酵母细胞凝集试验结果表明, 野生株呈现良好的凝集效果, 并能被 0.5%甘露糖完全抑制, 而 A2 *fimH* 缺失突变株未呈现任何凝集现象。体外生长试验结果表明, 在同样的培养条件下, A2 *fimH* 缺失突变株生长周期的各个阶段都要稍慢于野生株。禽致病性大肠杆菌国内分离株 I 型菌毛黏附素 *fimH* 基因缺失突变株成功构建, 为进一步深入研究禽大肠杆菌 I 型菌毛与机体相互作用的分子机制, 肠道外感染的致病机理及对国内禽大肠杆菌病的防控策略奠定了一定基础。

关键词: Red 重组系统; I 型菌毛; *fimH* 基因; 生物学特性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0252-05

95%大肠杆菌分离株表达 I 型菌毛(或称甘露糖敏感性菌毛、共同菌毛), 与大肠杆菌(*Escherichia coli*) 其它毒力因子如溶血素、气囊素、P 菌毛、S 菌毛和 Curli 菌毛等相比较, I 型菌毛非常多见。*E. coli* 型菌毛表达与尿道定植和致病性有关, I 型菌毛为尿道致病性 *E. coli* 的毒力因子^[1,2], 也在启动 *E. coli* 与静止表面相互作用和生物膜建立上起着关键性作用^[3,4], 而超过 50%微生物感染与生物膜形成相关^[5]。已知 I 型菌毛复合菌体蛋白亚单位包括 *fimB*、*fimE*、*fimA*、*fimI*、*fimC*、*fimD*、*fimF*、*fimG*、*fimH*, 它们由位于染色体上的 Fim 操纵子基因编码一组结构单位、生物合成单位和调节元件^[6]。I 型菌毛由主要结构亚单位 *fimA* 和 3 个次要亚单位 *fimF*、*fimG* 及 *fimH*

组成^[7], 其中 *fimH* 位于 I 型菌毛顶端, 是 I 型菌毛和 D-甘露糖受体连接的特异性粘附素(adhesin), 介导 *E. coli* 与易感宿主细胞的特异性黏附作用, 其 N 末端前三分之一到二分之一部分存在受体结合区域, 赋予 I 型菌毛结合 D-甘露糖受体的能力, 因此 *FimH* 是 I 型菌毛特异性粘附于易感细胞表面甘露糖受体所必需的^[8]。基于 *fimH* 在 I 型菌毛中的关键作用, 利用噬菌体编码的 Red 重组酶的同源重组技术^[9]对禽致病性大肠杆菌(Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC)国内分离株 I 型菌毛黏附素 *fimH* 基因进行敲除, 构建 *fimH* 缺失突变株。该系统利用噬菌体 3 个蛋白质 Exo、Bet 和 Gam, 其中 Gam 抑制大肠杆菌 RecBCD 核酸外切酶 V 活性, 使外源线形 DNA 不立

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目; 江苏省自然科学基金(BK2005049); 江苏省六大人才高峰项目(2006)

*通讯作者。Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzgzhu@yzu.edu.cn, yzgzhu@hotmail.com

作者简介: 何素芬(1981-), 女, 河南安阳人, 硕士研究生, 主要从事病原微生物致病机理及免疫机理研究。

收稿日期: 2007-05-31; 修回日期: 2007-11-04

即被降解, Exo 和 Bet 引导线性 DNA 片段与同源区发生重组置换, 而且效率较传统的同源重组法高几十倍^[10]。*fimH* 基因缺失菌株的成功构建, 为进一步研究 *fimH* 在 APEC 型菌毛中的致病性和免疫原性, 尤其是比较野生型 APEC 和其相应 *fimH* 缺失株与机体的相互作用的精确机制具有非常重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与实验动物：APEC 分离株 A2(血清型 O2:K89), *E. coli* DH5 α 和巴斯德酵母菌(*Pichia pastoris*)GS115 株由本实验室保存。质粒 pKD46 含有温度敏感复制子, 阿拉伯糖诱导后能够表达 噬菌体重组酶 Gam, Bet 和 Exo; pKD3 含氯霉素抗性基因和 FRT 位点(FLP 重组酶识别位点); pCP20 是含氨苄抗性和氯霉素抗性基因的温度敏感型复制子, 携带能够表达 FLP 重组酶质粒。上述质粒均由美国宾夕法尼亚大学兽医学院微生物实验室馈赠。青年豚鼠购自扬州大学医学院实验动物中心。

1.1.2 主要试剂和仪器：*Taq* DNA 聚合酶, DNA 凝胶回收试剂盒, DNA Marker DL2000 均购自 TaKaRa 公司, Expand Long Template PCR System 购自 Roche 公司, pGEM-T Easy Vector, T4DNA 连接酶购自 Promega 公司, MicroPulser Electroporator 购自 Bio-Rad 公司。

1.1.3 同源重组和 *fimH* 缺失突变鉴定用引物设计：用于同源重组的一对引物 P1、P2 分别由两部分组成, 靠近 5 端加划线的序列与 *fimH* 基因两翼序列同源, 靠近 3 端未加下划线的序列与质粒 pKD3 上 *cat* 基因两侧序列互补。在 *E. coli fimH* 基因同源重组区域外侧, 设计一对引物 P3、P4 用于检测 *fimH* 基因缺失突变株。上述引物由上海基康生物技术公司合成(表 1 示)。

表 1 PCR 引物, 寡核苷酸序列和扩增片段大小
Table 1 The sequence and oligonucleotide primers for the PCR and size

Primer	Sequence(5' 3')	Size/bp
P1	ATGAAACGAGTTATTACCTGTTTGC	1114
	TGACTGCTGATGGGCTGGTTCGGTTG TG TGAGCTGGAGCTGCTTCG	
P2	TTATTGATAAAACAAAAGTCACGCCAA	883/183*
	TAATCGATTGCACATTCCCTGCCATAT GAATATCCTCCTTAG	
P3	ATGAAACGAGTTATTACCTGTT	
P4	CGCCAATAATCGATTGCACATT	

* Represents mutant with *fimH* gene deletion.

1.2 融合 PCR 产物的制备和纯化

以质粒 pKD3 做为模版, P1、P2 为引物, 按长引物条件进行 PCR 扩增。经鉴定的 PCR 产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收纯化并测定 DNA 浓度。

1.3 Red 重组功能的诱导和感受态细胞的制备

将 pKD46 质粒转化到 *E. coli* A2 菌株中, 加入 L-阿拉伯糖至 30mmol/L, 诱导 1h, 使 pKD46 上的 Exo、Bet 和 Gam 3 个蛋白充分表达后, 制备感受态细胞, 每管分装 40 μ L, 存放于 -70 冰箱待用。

1.4 电转化和 Red 同源重组

将纯化 PCR 产物 100ng 与感受态细胞混合物加入到 0.1cm 的 Bio-Rad 电极杯中, 在电压 1.8KV, 脉冲 25 μ F, 电阻 200 欧姆的参数下进行电击转化, 并涂布于含有氯霉素的 LB 平板上 37 过夜, 筛选 *fimH* 基因缺失突变株 A2 *fimH::Cat*。

1.5 FLP 位点专一性重组

将质粒 pCP20 导入 *fimH* 基因缺失突变株 A2 *fimH::Cat*, 涂布于含氨苄和氯霉素双抗性 LB 平板上, 30 培养筛选阳性转化子, 然后将获得阳性转化子转接无任何抗性的 LB 中, 42 培养数小时, 再在 37 条件下划线培养分离单菌落, 对各个单菌落进行氨苄和氯霉素抗性检测, 获得对两种抗生素均敏感的突变株, 并将该突变菌株命名为 A2 *fimH*。

1.6 甘露糖敏感血凝(MSHA)和血凝抑制试验(MSRA), 酵母凝集试验和凝集抑制试验

A2 野生株和 A2 *fimH* 株在 LB 中培养至 OD_{600} =0.4, 用 0.2M pH7.2PBS 缓冲液离心洗涤 3 次后, 制备成 PBS 细菌悬液, 同时制备 1%豚鼠红细胞, 1%酵母菌悬浮液和 1% D-甘露糖溶液。MSHA 和 MSRA 试验按 Allan 等^[11], 酵母凝集试验和凝集抑制试验按 Sokurenko 等^[12]方法进行。观察玻板凝集试验并重复两次。

1.7 生长试验

分别挑取重组菌株 A2 *fimH* 和野生株 A2 单菌落接种于液体 LB 培养基过夜培养, 以 1:50 种子液转接于 100mL 液体 LB 中, 于 37 同步培养, 每隔一定时间取样测定 OD_{600} 值, 重复上述试验两次并绘制生长曲线。

1.8 互补试验

提取野生菌 A2 染色体 DNA 为模板, PCR 扩增出 *fimH* 基因, 经测序验证后, 将 *fimH* 基因克隆到表达载体 pBR322 中, 进一步将表达 *fimH* 基因的重组质粒 pBR322-*fimH* 转化到 A2 *fimH* 株中, 获得携带能

够表达 *fimH* 基因的 A2 *fimH* 重组菌并对其重组菌进行 MSHA、MSRA 和酵母凝集试验。

2 结果

2.1 融合 PCR 产物的制备

以质粒 pKD3 做为 DNA 模版, P1、P2 为引物, 扩增出两端与 *FimH* 基因上下游序列同源, 中间为氯霉素抗性基因 *cat* 的 DNA 片段, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定大约为 1.1kb, 与预期值大小一致。

2.2 氯霉素抗性基因替换 *fimH* 基因

融合 PCR 产物电转化至已含有 pKD46 的 APEC 分离株 A2 中, 在氯霉素的平板上, 37 过夜培养后共筛选到阳性克隆 4 个。分别挑选上述 4 个氯霉素抗性的重组菌落在 LB 肉汤中过夜培养, 提取各自 DNA 模板后, 以 P3 和 P4 为引物进行 PCR 扩增鉴定, 对照野生型扩增片段为 883bp, 重组体为 1114bp 大小, 所鉴定的 4 个氯霉素抗性克隆全部为 1114bp 大小的正确重组子, 命名为 A2 *fimH::Cat*。

2.3 氯霉素抗性基因的消除

质粒 pCP20 导入 A2 *fimH::Cat* 重组菌, 经二次重组后获得氨苄和氯霉素均敏感的二次重组菌 4 个, 单菌落提取各自模板 DNA 后, 以 P3 和 P4 为引物进行 PCR 扩增鉴定, 对照野生型为 883bp, 重组体为 183bp 大小, 所鉴定的上述 4 个重组菌全部为 183bp 大小的正确重组子, 命名为 A2 *FimH*。进一步对上述获得的 A2 *fimH* 重组菌的 *FimH* 基因两侧序列克隆和序列测定, 结果证明(图1)经二次重组后获得的 4 个重组菌株 A2 *fimH* 中 型菌毛 *fimH* 基因中氯霉

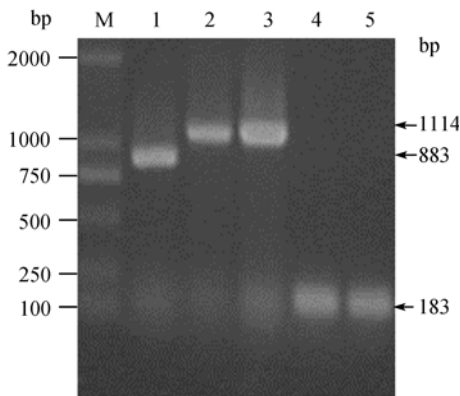


图1 A2Δ*fimH* 缺失株的 PCR 鉴定
Fig.1 Identification of A2 *fimH* deletion mutant by PCR.
M: molecular mass marker DL2000; 1: wild type APEC A2 isolate; 2 and 3: different 1st recombinants A2 *fimH::Cat*; 4 and 5: different 2nd recombinants A2 *fimH*.

素抗性基因 *cat* 已完全丢失。

2.4 MSHA、MSRA 和酵母菌凝集特性

野生型 APEC A2 株能与 1%豚鼠红细胞悬液呈现很快的凝集现象, 凝集呈均匀的颗粒状, 且对 D-甘露糖敏感, 其凝集性能被 1%D-甘露糖溶液完全抑制。野生株 A2 与酵母细胞凝集作用与豚鼠红细胞一样, 野生株 A2 同样凝集酵母细胞, 其凝集能力同样能被 1%D-甘露糖溶液完全抑制。而 A2 *fimH* 缺失突变株对上述两种细胞未呈现任何可见凝集现象。

2.5 A2Δ*fimH* 缺失突变株在 LB 的生长

以在 LB 中培养各时间段所测定的细菌密度对培养时间做图, 和野生菌 A2 同步比较, A2 *fimH* 缺失突变株的生长周期的各个阶段都要稍慢于野生株(图 2)。

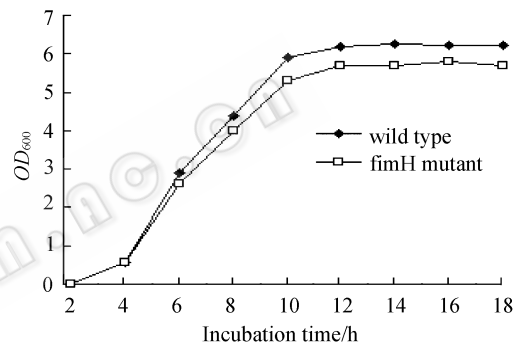


图2 野生型和突变菌株的生长曲线
Fig.2 Growth curve of wild-type A2 isolate and A2 *fimH* mutant.

2.6 互补试验

fimH 基因互补试验表明: 携带能够表达 *fimH* 基因的重组质粒 pBR322-*fimH* 转化到 A2 *fimH* 缺失突变株后所获重组菌, 重新获得了 型菌毛具备的凝集活性, 与野生菌凝集特性一样, 能良好的凝集豚鼠红细胞和酵母细胞, 并能被 D-甘露糖完全抑制。

3 讨论

早期的特定基因缺失型菌株的构建主要是利用自杀性载体技术, 该技术的应用虽然广泛, 但它的操作较为繁琐, 构建时需较大的同源 DNA 片段, 且必须构建具有靶位点的打靶质粒^[13]。Red 同源重组技术为我们的重组菌构建工作带来了极大的方便, 它只需要很短的同源臂(两端各有 30 ~ 50bp 与目的基因侧翼序列同源的片段)即可对染色体上的任意基因实施精确重组, 如此短核酸序列完全可以人工合成, 通过 PCR 产生两端带有上述同源臂的 DNA 片段即可用在

Red 系统指导下进行的快速基因敲除。该方法是最近几年才发展起来的一项新技术, 操作简便, 重组效率高^[9]。该重组技术可直接对染色体进行修饰, 是构建基因缺失菌株和基因功能研究的强有力手段。本试验我们采用 Red 同源重组技术对 APEC 国内分离株 A2 染色体上编码的 型菌毛黏附素 *fimH* 基因进行敲除, 构建了 A2 *fimH* 缺失突变株, 经测序鉴定 A2 *fimH* 缺失突变株染色体上的 *fimH* 基因序列大部分已缺失, 从而造成回复突变的可能性极低。将 *fimH* 基因克隆到表达载体 pBR322 中构建成重组质粒 pBR322-*fimH*, 然后将其转化入 A2 *fimH* 缺失突变株中, 重新获得了 型菌毛具备的豚鼠红细胞和酵母菌凝集活性, 且能被 D-甘露糖完全抑制。通过基因互补试验证明 FimH 是 型菌毛特异性粘附于甘露糖受体分子所必需的^[14]。该缺失突变株在 LB 中培养, 整体来看, 几乎和野生菌 A2 一样同步生长, 而 A2 *fimH* 缺失株的生长周期的各个阶段都要稍慢于野生株 A2。对 A2 *fimH* 缺失突变株和牛乳腺上皮细胞 Mac-T 和人肺上皮细胞 A549 体外黏附试验结果表明, A2 *fimH* 缺失突变株黏附性与野生菌 A2 仅存在稍微的差异(另文报道)。事实上, 在作者实验室, 我们已成功构建 4 株不同 APEC 和 1 株禽源非致病性大肠杆菌 *fimH* 缺失突变株, 并获得与 A2 *fimH* 缺失突变株相似的生长特性和无凝集活性。上述基础研究的开展有利于深入比较 A2 *fimH* 缺失突变株和野生菌株生物学和分子病原学特性。

禽大肠杆菌病是由禽致病性大肠杆菌(APEC)引起的一种最常见的重要细菌性传染病。由于 APEC 血清型众多复杂, 目前尚无商品化疫苗使用以及许多抗生素低效和带来的蓄积、毒副作用等众多因素影响, 该病给我国养禽业造成的经济损失尤为严重。鉴于 FimH 是 型菌毛特异性粘附素, 而 型菌毛介导的 APEC 黏附到禽呼吸道上皮细胞是 APEC 主要入侵机体的第一步, 是病原菌在宿主体内定居、增殖、释放毒力因子发挥致病作用的关键。APEC 国内分离株 型菌毛黏附素 *fimH* 基因缺失突变株 A2 *fimH* 成功构建, 为进一步深入研究禽大肠杆菌 型菌毛与机体相互作用的分子机制, 肠道外感染的致病机理及对国内禽大肠杆菌病的防控策略奠定了一定基础。如 *fimH* 基因型和表型差异如何影响 型菌毛的粘附功能和影响定植部位的生态小境, 尤其是禽肠道外 APEC 感染适合的生态小境影响? *fimH* 如何直接参

与 APEC 型菌毛在粘附、生物膜形成和侵入等毒力特征上的多功能作用? *fimH* 直接引起易感宿主细胞信号传导、级联放大并进一步导致细菌内化^[15]的关键步骤和因素?

致谢 在研究过程中得到军事医学科学院王恒樑和章金刚两位博士的大力帮助, 在此一并致谢!

参 考 文 献

- [1] Connell I, Agace W, Klemm P, et al. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9827-9832.
- [2] Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, et al. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 1998, 282(5393): 1494-1497.
- [3] Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*, 1998, 30(2): 285-293.
- [4] Pratt LA, Kolter R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(6): 598-603.
- [5] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [6] Klemm P, Jørgensen BJ, van Die I, et al. The *fim* genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 1985, 199(3): 410-414.
- [7] Ofek I, Goldhar J, Eshdat Y, et al. The importance of mannose specific adhesions (lectins) infections caused by *Escherichia coli*. *Scand J Infect Dis Suppl*, 1982, 33: 61-67.
- [8] Knudsen TB, Klemm P. Probing the receptor recognition site of the FimH adhesion by fimbriae-displayed FimH-FocH hybrids. *Microbiology*, 1998, 144 (pt7): 1919-1929.
- [9] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [10] Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: A powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(10): 769-79.
- [11] Allan BJ, van den Hurk JV, Potter AA. Characterization of *Escherichia coli* isolated from case of avian colibacillosis. *Can J Vet Res*, 1993, 57(3): 146-151.
- [12] Sokurenko EV, Courtney HS, Ohman DE, et al. FimH Family of Type 1 Fimbrial Adhesins: Functional Heterogeneity due to Minor Sequence Variations among FimH Gene. *J Bacteriol*, 1994, 176(3): 748-755.
- [13] Edwards RA, Keller LH, Schifferli DM. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene ex-

pression. *Gene*, 1998, 207(2): 149–157.

- [14] Yamamoto T, Fujita K, Yokota T. Adherence characteristics to human intestinal mucosa of *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea or urinary tract infections. *J Infect Dis*, 1990, 162(4): 896–908.
- [15] Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, *et al.* Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J*, 2000, 19(12): 2803–2812.

Construction and characterization of type I fimbriae *fimH* deletion mutant from avian pathogenic *Escherichia coli*

Sufen He¹, Zhiwei Yuan^{1, 2}, Guoqiang Zhu^{1, *}

(¹College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

(²Rongcheng Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Rongcheng 264300)

Abstract: The wild type avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolate A2 (Serotype O2:K89) was selected as the prototype of the (APEC) Type I Fimbriae. Based on the original sequences of Type I Fimbriae operon gene clusters in the GenBank, we generated PCR products by using primers with the homologies extension of *fimH* gene to be deleted and template plasmid pKD3 carrying selectable antibiotic chloramphenicol resistance (*cat*) gene that is flanked by FRT (FLP recognition target) sites. By using the PCR products, the A2 Δ *fimH*::*Cat* deletion mutant from A2 isolate was constructed by λ Red-mediated recombination system in the flanking homologies. After selection, the resistance gene located in the A2 Δ *fimH*::*Cat* mutant was eliminated in the second recombination, by using a helper plasmid pCP20, a temperature-sensitive one encoding and expressing the FLP recombinase, which acts on the directly repeated FRT sites flanking the resistance gene. The A2 Δ *fimH* mutant obtained was further confirmed by *fimH* PCR amplification and sequencing. The A2 Δ *fimH* mutant with the deletion of *fimH* adhesin in the *fim* gene cluster lost the ability of agglutination reaction with both guinea pig erythrocytes and yeast cells. The A2 Δ *fimH* deletion mutant restored the agglutination ability of both binding guinea pig erythrocytes and yeast cells when transfected the compatible recombinant plasmid pBR322-*fimH* with *fimH* insert in the *fimH* complementation assay. Very similar to the wild type A2 isolate, The obtained binding activity from the A2 Δ *fimH* mutant in the complementation assay was completely inhibited when pretreated with 0.5% mannose solution. Compared with the wild type isolate, the A2 Δ *fimH* mutant grew slowly during all stages of growth. This work provides the basis for us to study the molecular pathogenesis mechanisms of interaction between the APEC Type I Fimbriae and susceptible host cells, extra-intestinal infection, prevention and control of the APEC-caused disease.

Keywords: λ Red recombination system; avian *Escherichia coli* type I fimbriae (APEC); *fimH* mutant; biological characteristics

Supported by the Scientific Research Foundation for the Returned overseas Chinese Scholars of State Education Ministry, the Jiangsu Science Foundation (BK2005049) and the Jiangsu Talent Project 2006

*Corresponding author. Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzqzhu@yzu.edu.cn, yzqzhu@hotmail.com

Received: 31 May 2007/Revised: 14 November 2007